

RECEIVED

S N 09 616526

TECH. CEN. PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: ABDUL MALAK et al. Examiner: Unknown
Serial No.: 09 616526 Group Art Unit: Unknown
Filed: July 14, 2000 Docket No.: 11123.15US01
Title: PROCESSES FOR THE PREPARATION OF NOVEL COLLAGEN-
BASED SUPPORTS FOR TISSUE ENGINEERING, AND
BIOMATERIALS OBTAINED



CERTIFICATE UNDER 37 CFR 1.8: The undersigned hereby certifies that this Transmittal Letter and the paper, as described herein, are being deposited in the United States Postal Service, as first class mail, with sufficient postage, in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231, on October 5, 2000.

By:

Julie J. Wang

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Applicants enclose herewith one certified copy of a France application, Serial No. 00
06743, filed May 26, 2000, the right of priority of which is claimed under 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

MERCHANT & GOULD P.C.
P.O. Box 2903
Minneapolis, MN 55402-0903
(612) 332-5300

Dated: October 5, 2000

By

John J. Gresens
Reg No. 33,112
JJG:jjw





RECEIVED

TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION



CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris le

Martin PLANCHE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

| | | | |
|--|----------------------|---|---------------|
| REMISE DES PIÈCES DATE 26 MAI 2000 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0006743 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 26 MAI 2000 | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET BEAU DE LOMENIE 158, rue de l'Université 75340 PARIS CEDEX 07 | |
| Vos références pour ce dossier (facultatif) H19781/0039/GPO | | | |
| Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie | | | |
| 2 NATURE DE LA DEMANDE | | Cochez l'une des 4 cases suivantes | |
| Demande de brevet | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Demande de certificat d'utilité | | <input type="checkbox"/> | |
| Demande divisionnaire | | <input type="checkbox"/> | |
| Demande de brevet initiale | | N° | Date / / |
| ou demande de certificat d'utilité initiale | | N° | Date / / |
| Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> | | <input type="checkbox"/> | N° Date / / |
| 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) <p>"Procédés de préparation de nouveaux supports a base de collagène pour l'ingénierie tissulaire et biomatériaux obtenus".</p> | | | |
| 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE | | Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | |
| 5 DEMANDEUR | | <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» | |
| Nom ou dénomination sociale | | COLETICA | |
| Prénoms | | | |
| Forme juridique | | SOCIETE ANONYME | |
| N° SIREN | | | |
| Code APE-NAF | | | |
| Adresse | Rue | 32 rue Saint Jean de Dieu | |
| | Code postal et ville | 69007 | LYON |
| Pays | | FRANCE | |
| Nationalité | | FRANCAISE | |
| N° de téléphone (facultatif) | | | |
| N° de télécopie (facultatif) | | | |
| Adresse électronique (facultatif) | | | |

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **26 MAI 2000**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0006743

08 540 W / 260895

Vos références pour ce dossier :

(facultatif)

H19781/0039/GPO

6 MANDATAIRE

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

CABINET BEAU DE LOMENIE

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

158, rue de l'Université

Code postal et ville

75340

PARIS CEDEX 07

N° de téléphone (facultatif)

01.44.18.89.00

N° de télécopie (facultatif)

01.44.18.04.23

Adresse électronique (facultatif)

7 INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ Oui

☒ Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée

8 RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒

☐

Paiement échelonné de la redevance

Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques

☐ Oui

☐ Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐ Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)

PORTAL Gérard
CPI N° 92-1203

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**

M. ROCHET

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersburg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

| | | | |
|---|----------------------|--|--------------------------|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | | H19781/0039/GPO | |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | | 0006743 | |
| TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) | | | |
| "Procédés de préparation de nouveaux supports a base de collagène pour l'ingénierie tissulaire et biomatériaux obtenus". | | | |
| LE(S) DEMANDEUR(S) : | | | |
| COLETICA | | | |
| "SOCIETE ANONYME". | | | |
| DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages). | | | |
| Nom | | ABDUL MALAK | |
| Prénoms | | Nabil | |
| Adresse | Rue | 27, Rue Frédéric Mistral | |
| | Code postal et ville | 69300 | CALUIRE FRANCE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | ANDRE | |
| Prénoms | | Valérie | |
| Adresse | Rue | 15, Rue de Montlys Verenay | |
| | Code postal et ville | 69420 | AMPUIS FRANCE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| Nom | | HUC | |
| Prénoms | | Alain | |
| Adresse | Rue | 26, Chemin des Santons | |
| | Code postal et ville | 69110 | Ste. FOY LES LYON FRANCE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | | |
| DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) | | PARIS LE 26 MAI 2000 CABINET BEAU DE LOMENIE PORTAL Gérard CPI N° 92-1203 | |

Depuis de nombreuses années, le collagène s'est révélé être un substrat irremplaçable pour la réalisation de tissus artificiels renfermant des
5 cellules vivantes.

Les biomatériaux obtenus sont de plus en plus utilisés dans le domaine pharmaceutique et leur avenir semble très prometteur pour la préparation des tissus conjonctifs lésés ou pour la thérapie génique en permettant l'introduction et la survie de cellules modifiées dans un organisme vivant.

10 De plus pour des tests « in vitro », les industries cosmétique et dermo-pharmaceutique font de plus en plus appel aux peaux reconstruites et ceci, d'autant plus, que dans ces disciplines, les tests sur animaux sont de moins en moins utilisés.

C'est pourquoi, plusieurs équipes de recherche dans le monde se sont
15 efforcées de mettre au point des supports à base de collagène pour la réalisation de tissus artificiels vivants, tels que des peaux, des cartilages, des os, des tendons ou des cornées reconstruites. Les domaines d'application de ces nouveaux biomatériaux sont donc nombreux.

Il est à noter que les principaux travaux réalisés dans le domaine
20 concerné par l'invention sont dus principalement aux équipes de : Yannnas I., Collombel C., Tinois E., Boyce S., Eisenberg H., Bell E., Kuroyanagi Y., Maruguchi T., Hanthamrongwit M., Auger F.A., et Osborne C.S., par exemple voir brevet US 5,273,900.

Tous ces chercheurs utilisent soit des gels, soit des éponges de
25 collagène, ces dernières étant obtenues par lyophilisation.

Les principales difficultés à surmonter pour la réalisation des supports destinés à l'obtention des tissus artificiels vivants sont les suivantes : bonne résistance mécanique, faible sensibilité à des températures avoisinant 37° C, propriétés biologiques favorables au développement et au métabolisme cellulaires,
30 faible susceptibilité vis-à-vis de la dégradation enzymatique et, enfin, pour certaines applications et en particulier la peau reconstruite, présence préférable d'une structure bicouche dans laquelle l'une des couches est la plus compacte possible et l'autre poreuse.

Jusqu'à maintenant, les recherches effectuées n'avaient pas permis
35 d'obtenir des supports collagéniques répondant de façon satisfaisante à l'ensemble des contraintes énumérées plus haut.

La présente invention a pour objet de résoudre ces problèmes restés en suspens tant sur le plan technique que sur le plan industriel.

La présente invention permet de résoudre l'ensemble de ces problèmes techniques d'une manière particulièrement simple, peu coûteuse, utilisable à l'échelle industrielle et en particulier à l'échelle industrielle cosmétique, dermo-pharmaceutique ou pharmaceutique.

Selon un premier aspect, la présente invention fournit un nouveau produit composite formant un support collagénique comprenant au moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique réalisée soit par un film collagénique préparé par séchage, de préférence à l'air ou dans un fluide gazeux, d'un gel de collagène, soit par une éponge collagénique très fortement comprimée.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse du produit composite selon l'invention, la compression de l'éponge collagénique comprimée est réalisée à une pression au minimum égale à environ 50 bars, équivalent à environ $50 \cdot 10^5$ Pascals (Pa), de préférence comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa), éventuellement cette compression ayant lieu à une température comprise entre 20 et 80 degré C°, encore mieux entre 40 C° et 60 C°.

Selon une caractéristique avantageuse, ce produit composite est caractérisé en ce que le produit collagénique précité est choisi parmi du collagène et un mélange de collagène avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, le chitosane, et les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

Selon encore une caractéristique avantageuse de ce produit composite, celui-ci est caractérisé en ce qu'au moins une des deux couches, respectivement la couche poreuse et la membrane essentiellement compacte, comprend des cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes en particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

Selon une variante de réalisation avantageuse, les cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, adipocytes, sébocytes, chondrocytes,

cellules osseuses, des chondrocytes, des ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine, normales ou génétiquement modifiées ou malignes.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse, le produit composite est caractérisé en ce qu'il contient des fibroblastes normaux ou
 5 génétiquement modifiés ou malins dans la couche poreuse et des cellules vivantes normales ou génétiquement modifiées ou malignes, à la surface de la membrane compacte en particulier choisies parmi des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.

10 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, il peut être particulièrement intéressant de préparer soit des peaux reconstruites "jeunes" en utilisant des cellules prélevées sensiblement exclusivement sur des sujets jeunes, soit des peaux reconstruites "âgées" obtenues à partir de cellules prélevées sensiblement exclusivement sur des sujets âgés. Grâce à ces modèles, il
 15 sera possible d'améliorer les connaissances sur le processus du vieillissement cutané et d'étudier l'influence d'actifs sur ce processus.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la membrane essentiellement compacte est préparée préalablement à la combinaison avec la couche poreuse, de préférence comprenant une éponge
 20 collagénique, en particulier en préparant la membrane et en la déposant sur un gel collagénique avant que l'ensemble ne soit congelé et lyophilisé pour obtenir ledit produit composite.

Selon encore un autre mode de réalisation du produit composite selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce que l'éponge collagénique et/ou le film
 25 collagénique et/ou la membrane collagénique, comprend du collagène d'origine mammifère, en particulier d'origine bovine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du produit composite selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce qu'au moins l'une des deux couches est réalisée à partir d'un gel collagénique contenant un mélange de
 30 collagène soluble et de collagène insoluble, par exemple sous forme de fibres.

Dans le cas du produit composite selon l'invention, le collagène peut être du collagène de type I et/ou de type III.

Selon un deuxième aspect, la présente invention couvre aussi un procédé de fabrication d'un produit composite comprenant au moins une couche
 35 poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique, caractérisé en ce que :

a) on prépare tout d'abord la membrane essentiellement compacte collagénique, soit par séchage d'un premier gel collagénique, de préférence par séchage à l'air ou à l'aide d'un fluide gazeux, soit par compression d'une éponge collagénique obtenue par congélation- lyophilisation d'un gel collagénique ;

5 b) on prépare séparément un deuxième gel collagénique ;

c) soit on dépose la membrane essentiellement compacte sur le deuxième gel collagénique, soit on verse le deuxième gel collagénique sur la membrane essentiellement compacte ; et

10 d) on procède enfin à une congélation-lyophilisation de l'ensemble pour obtenir ledit produit composite.

Selon une variante avantageuse de ce procédé, celui-ci est caractérisé en ce qu'on réalise une compression de l'éponge collagénique servant à préparer la membrane compacte à une pression au moins égale à 50 bars (d'environ $50 \cdot 10^5$ Pa), de préférence comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars
15 ($200 \cdot 10^5$ Pa).

Avantageusement l'étape de compression a lieu à une température comprise entre 20 à 80°C, encore de préférence entre 40°C et 60°C.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ce procédé, celui-ci est caractérisé en ce qu'on utilise pour la préparation de l'éponge collagénique
20 et/ou du film collagénique et/ou de la membrane collagénique, soit du collagène, soit un mélange de collagène avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, le chitosane, les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

25 Selon une autre variante de réalisation, le procédé est caractérisé en ce qu'on réalise une réticulation d'au moins l'une des deux couches ou des deux.

Selon une variante de réalisation avantageuse, la réticulation précitée est une réticulation physique, en particulier une déshydratation thermique à chaud sous vide ou DHT, ou une réticulation chimique, en particulier au
30 diphénylphosphorylazide ou DPPA, avec une aldéhyde telle que glutaraldéhyde, au carbodiimide, ou au succinimide.

Selon une autre variante de réalisation avantageuse de ce procédé, celui-ci est caractérisé en ce qu'on ajoute lors de la fabrication un composé favorisant le développement cellulaire, en particulier un facteur de croissance, en
35 particulier une cytokine, une chimiokine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, celui-ci est caractérisé en ce qu'on prévoit une étape d'introduction de cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes dans au moins une des deux couches.

5 Selon une variante de réalisation avantageuse, lesdites cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, des chondrocytes, cellules osseuses en particulier ostéoblastes,
10 cellules de Merkel d'origine sanguine, des sébocytes, des adipocytes, des cellules nerveuses.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'on introduit des fibroblastes dans la couche poreuse.

15 Selon un mode de réalisation encore préféré de l'invention, le procédé est caractérisé en ce qu'on dépose des cellules vivantes à la surface de la membrane compacte, en particulier choisies parmi des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules
20 nerveuses.

Selon une variante de réalisation de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que les cellules vivantes sont apportées soit par culture séquentielle, soit par culture concomitante entre les différents types de cellules, ces cellules provenant de culture ou de biopsie.

25 Selon un troisième aspect, la présente invention couvre aussi l'utilisation du produit composite formant un support collagénique tel que précédemment défini, ou tel qu'obtenu par le procédé tel que précédemment défini, ou tel que résultant de la description suivante notamment faite en relation avec les exemples pour lesquels toute caractéristique, qui apparaît être nouvelle
30 par rapport à un état de la technique quelconque, est revendiquée en tant que telle dans sa fonction et dans sa généralité, pour la fabrication de peaux artificielles destinées notamment à réaliser des essais in vitro d'efficacité de substance potentiellement active, ou à reconstruire in vivo des zones de peau endommagées.

 Selon une caractéristique avantageuse, les peaux artificielles peuvent
35 être obtenues soit sensiblement exclusivement à partir de cellules jeunes, soit sensiblement exclusivement à partir de cellules âgées, en particulier pour étudier

le processus de vieillissement tissulaire et en particulier cutané et éventuellement tester l'efficacité de principes actifs sur ce processus.

On comprend ainsi que l'invention permet de résoudre les problèmes techniques précités.

5 Dans le but d'obtenir les matériaux collagéniques les plus résistants, les inventeurs ont plus particulièrement mis en œuvre le procédé décrit dans le brevet US 5 333 092 délivré le 19 juillet 1994. Cette technique permet d'obtenir un mélange de collagènes de type I et de type III solubles et insolubles natifs, très
10 résistants aussi bien sur le plan mécanique que vis-à-vis de la digestion enzymatique. Ces deux dernières caractéristiques pourront être éventuellement renforcées par toute technique de réticulation ou par adjonction de substances ayant de fortes interactions avec le collagène et ne présentant pas de toxicité vis-à-vis des cellules. De plus, ce procédé d'obtention du collagène permet de rendre
15 presque inexistant le risque de contamination biologique due aux bactéries, virus ou prions.

Pour le cas des supports destinés à l'obtention des peaux reconstruites, les inventeurs ont eu l'idée de préparer des matériaux bicouches en réalisant d'abord la couche la plus compacte et ensuite l'éponge poreuse. Cette méthodologie a l'avantage de conduire à l'obtention d'une couche de surface
20 beaucoup plus compacte que toutes celles qui avaient été décrites jusqu'à maintenant. En particulier, de ce fait, des éponges compactées par de fortes compressions ou des films peuvent être ainsi fixés sur des matrices poreuses.

L'utilisation des supports décrits plus haut pour des applications d'ingénierie tissulaire implique l'ensemencement des cellules vivantes ou
25 génétiquement modifiées, le développement des cellules pouvant se faire soit à l'intérieur du support collagénique soit à sa surface.

Les tissus vivants reconstruits ainsi obtenus peuvent être utilisés dans de nombreuses applications cosmétique, dermopharmaceutique ou pharmaceutique en tant que :

- 30 . modèles « in vitro » permettant de simuler les effets des ingrédients sur les métabolismes cellulaires afin d'évaluer l'efficacité et la toxicité de matières premières ou de formulations plus complexes ;
- . tissus reconstruits capables de pallier les déficiences de tissus endommagés : peaux, cartilages, os, tendons, cornées ;

. implants vivants renfermant des cellules modifiées capables de pallier certaines déficiences de l'organisme, en particulier dans le domaine de la thérapie génique.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront
 5 clairement à la lumière de la description explicative, qui va suivre, faite en référence à divers exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration, et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Comme précédemment indiqué, dans les exemples, toute
 10 caractéristique, qui apparaît nouvelle par rapport à un état de la technique quelconque, est revendiquée dans sa fonction et dans sa généralité, indépendamment du contexte de l'exemple. En outre, les exemples 6 à 13 constituent des modes de réalisation actuellement préférés des produits composites selon l'invention formant support collagénique. L'exemple 14 vise des
 15 essais comparatifs démontrant l'intérêt des produits composites selon l'invention comme support collagénique pour la fabrication de peaux artificielles destinées notamment à réaliser des essais in vitro d'efficacité de substance potentiellement active, ou à reconstruire in vivo des zones de peau endommagées.

L'exemple 15 montre un essai comparatif d'utilisation d'un produit composite selon l'invention constituant une peau artificielle préparée à partir de
 20 cellules de donneurs jeunes vis-à-vis de peaux reconstruites obtenues à partir de cellules de donneurs âgés, dans le cadre de procédure de tests d'efficacité d'un principe actif pour étudier le processus de vieillissement cutané, notamment par la quantification des laminines produites.

Dans les figures annexées :

25 - la figure 1 représente une vue en coupe, après marquage par coloration histologique classique, d'un produit composite selon la présente invention réalisé à partir d'une couche poreuse inférieure de collagène bovin, surfacée sur la face supérieure d'une membrane supérieure essentiellement compacte collagénique réalisée par un film collagénique préparé par séchage à l'air
 30 d'un gel de collagène, dans les conditions de l'exemple 6,

- la figure 2 représente une coupe similaire obtenue avec une simple matrice poreuse préparée avec le même gel de collagène bovin, mais non surfacée, c'est-à-dire dans les conditions de l'exemple 1, montrant la présence d'inclusion de kératinocytes en profondeur, non limitée à la surface,

35 - la figure 3 représente la quantité de laminines présentes dans les milieux d'incubation de peaux reconstruites, respectivement, de peaux

reconstruites jeunes, obtenues à partir de cellules prélevées sur des donneurs de 25 à 35 ans ; et de peaux reconstruites matures ou âgées, obtenues à partir de cellules prélevées sur des donneurs de plus de 55 ans, afin de montrer l'influence de l'âge des donneurs, les résultats étant exprimés sous forme de "bâton", la quantité de laminines produites étant exprimée en ordonnées en pourcentage du témoin (PRJ = peaux reconstruites jeunes),

- la figure 4 représente l'effet inducteur d'un extrait de malt fermenté commercialement disponible sous la marque BASALINE[®], COLETICA, France sur la production de laminines dans des peaux reconstruites matures, la quantité de laminines produites étant également exprimée en pourcentage du témoin, et

- la figure 5 représente l'effet compensateur du même extrait de malt fermenté ou BASALINE[®], avec en ordonnées la quantité de laminines produites en pourcentage du témoin.

15 **EXEMPLE 1**

Préparation d'une matrice poreuse de collagène natif selon la technique du brevet US N°5331092

A - Obtention du collagène natif

20 Un gel est préparé à partir de peaux de veaux préalablement lavées (2 heures) puis épilées par un mélange de chaux-sulfure (chaux : 3.5 %, sulfure de sodium : 2.5 %) à raison de 400g de peau (matière sèche : environ 30 %) pour 250 ml d'eau. Ce bain s'effectue sous une rotation de 4 t/mn pendant 30 minutes.

25 La durée totale de la dépilation est de 36 heures.

Les peaux sont ensuite déchaulées dans un bain contenant du chlorure d'ammonium (3 %) et du métabisulfite de sodium (0.5 %), à raison de 400 g de peau pour 50 ml de bain.

La durée totale de ce bain est de 2 heures et trente minutes.

30 Les sels sont éliminés par deux lavages successifs à l'eau (15 minutes par lavage), à raison de 200 ml d'eau pour 100 g de tissu.

Des peaux sont alors broyées, puis lavées, sous agitation pendant 1 heure, par du tampon phosphate pH 7.8 (dihydrogénophosphate de potassium 0.78g/l et monohydrogénophosphate disodique 21.7 g/l), à raison de 5 l de

35 tampon/l kg de broyat. Le phosphate est ensuite éliminé par deux lavages

successifs à l'eau permutée, puis par une centrifugation en continu à 4000 rpm (décanteuse Rousselet), à raison de 5l d'eau pour 1 kg de broyat.

Le broyat est alors acidifié par une solution d'acide acétique à 10 %, la quantité d'acide acétique étant de 5 % par rapport au collagène, la molarité finale est d'environ 0.08 M.

Le broyat est alors malaxé pendant une heure afin d'obtenir une pâte.

Le gel est obtenu par passage en continu de la pâte dans un appareil de traitement aux ultra sons de type UTL T/-6. Ce gel a une concentration comprise entre 0.7 et 2 % en collagène, la proportion de collagène acido-soluble variant de 10 à 20 %, par rapport au collagène insoluble.

B - Préparation de la matrice poreuse grâce au gel de collagène obtenu comme indiqué précédemment

20 g de gel de collagène par cm^2 (matière sèche = 0.75 %) sont placés dans un plateau de lyophilisation et lyophilisés : la congélation s'effectue à -30°C puis le chauffage à $+32^\circ\text{C}$. La lyophilisation dure au total 16 heures sous une pression de 400 microbars.

Le lyophilisat est réticulé par réticulation physique (DHT) : le lyophilisat est placé 10 heures dans une étuve à 110°C et 400 microbars de pression.

EXEMPLE 2

Préparation d'une matrice poreuse réticulée grâce au diphénylphosphorylazide (DPPA) selon la technique décrite dans le brevet européen N° 466 829 du 24 juillet 1996

Le lyophilisat de collagène est incubé 24 h dans une solution renfermant 5 à 250 μl de DPPA/g de collagène contenu dans 100 ml de diméthyl formamide (DMF). Le collagène est ensuite débarrassé du DPPA par rinçage dans 100 ml de DMF. Le DMF est ensuite éliminé par rinçage dans 100 ml d'une solution de tampon borate pH 8.9 (tétraborate de sodium 0.04 M, acide borique 0.04 M).

Le collagène est finalement incubé pour une nuit dans le même tampon borate. Enfin le tampon borate est éliminé par rinçage à l'eau permutée en continu pendant 6 h.

EXEMPLE 3

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le carbodiimide et le N-hydroxysuccinimide

5 Le collagène est réticulé avec de l'EDC (Ethyl dimethyl amino-propyl carbodiimide) à la concentration de 0.23 à 0.69 g/g de collagène, et avec de NHS (N-hydroxysuccinimide) à la concentration de 0 à 0.42 g/g de collagène.

Après rinçage à l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

10 **EXEMPLE 4**

Préparation d'une matrice poreuse réticulée par le glutaraldéhyde

Le collagène est réticulé pendant 24 à 96 h dans une solution contenant 0.6 à 1 % de GTA à 20°C.

Après rinçage avec l'eau permutée, le collagène est à nouveau lyophilisé.

15

EXEMPLE 5

Matrice poreuse préparée avec le collagène natif de l'exemple 1 en association avec du chitosane et un glycosaminoglycane comme décrit dans le brevet européen du 29 mai 1991 N° 296078.

20 A 600 g de gel à 1.5 % de collagène, sont ajoutés 2.5 g de chitosane dissous dans 356 ml d'eau et 1.9 ml d'acide acétique, puis une solution renfermant 1 g de chondroïtine 4 sulfate contenu dans 400 ml d'eau permutée. Le mélange dont le pH est d'environ 4.0 est ensuite agité puis lyophilisé.

L'éponge obtenue est réticulée par DHT.

25

EXEMPLE 6

Matrice poreuse décrite dans l'exemple 1 surfacée avec un film de collagène

A - Préparation du film

30 Le gel de collagène dont la matière sèche est comprise entre 0.3 et 0.8 % est séché dans une étuve à 30° C ou sous hotte à raison de 0.5 g de gel/cm² de plateau.

Dans le gel de collagène il est possible d'ajouter de 10 à 40 % de glycérol.

Le collagène séché dans ces conditions forme un film transparent.

35

B - Association du film avec la matrice poreuse décrite plus haut

0.5 g de gel de collagène en matière sèche, sont disposés par cm^2 dans un plateau de lyophilisation, puis le film de collagène est déposé sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé.

5 Le lyophilisat obtenu est réticulé par DHT.

EXEMPLE 7

Matrice poreuse préparée avec un gel de collagène acido-soluble surfacée avec un film de collagène

10 Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, la seule différence étant constituée par la nature du gel coulé sur le film qui est constitué de collagène acido-soluble préparé selon une technique bien connue de l'homme de l'art.

EXEMPLE 8

15 Matrice poreuse préparée avec un gel d'atélocollagène ou surfacée avec un film de collagène

20 Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, la seule différence étant constituée par la nature du gel coulé sur le film qui est constitué d'atélocollagène c'est-à-dire de collagène sans telopeptide préparé selon une technique bien connue de l'homme de l'art.

EXEMPLE 9

25 Matrice poreuse constituée de collagène associé avec du chitosane et un glycosaminoglycane surfacée avec un film de collagène.

Le procédé est celui indiqué dans l'exemple 6, mais dans ce cas, le gel coulé sur le film du collagène est constitué de collagène, de chitosane, d'un glycosaminoglycane. La préparation de ce gel est décrite dans l'exemple 5.

EXEMPLE 10

30 Toutes les matrices poreuses surfacées avec un film de collagène décrites précédemment peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 2, 3 et 4.

EXEMPLE 11

Matrice poreuse en collagène seul décrite dans l'exemple 1 surfacée avec une éponge de collagène comprimée.

5 **A - Préparation de l'éponge comprimée**

Le gel de collagène préparé comme dans l'exemple 1 et ayant une matière sèche comprise entre 0.3 et 1.5 % est lyophilisé de façon à obtenir une éponge ayant un poids compris entre 0.5 et 2 g/cm².

10 Le lyophilisat est comprimé pendant 5 à 60 secondes, à une température comprise entre 20 et 60° C et une pression située entre 50 et 200 bars (50 à 200.10⁵ Pa).

15 **B - Association de l'éponge comprimée avec la matrice poreuse**

Le gel de collagène décrit dans l'exemple 1 est déposé à raison de 0.5 g par cm² dans un plateau de lyophilisation. L'éponge comprimée est alors déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Une éponge poreuse de collagène surfacée avec une éponge comprimée de collagène est ainsi obtenue. L'ensemble est réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 1.

20 **EXEMPLE 12**

Matrice poreuse constituée de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane telle que décrite dans l'exemple 5 et surfacée avec l'éponge comprimée.

25 Le gel de collagène, de chitosane et de glycosaminoglycane, préparé selon le procédé de l'exemple 5 est déposé à raison de 0.5 g par cm² dans un plateau de lyophilisation, puis l'éponge comprimée est déposée sur ce gel et l'ensemble est lyophilisé. Le lyophilisat est alors réticulé par DHT comme décrit dans l'exemple 1.

EXEMPLE 13

30 Toutes les matrices poreuses surfacées avec une éponge de collagène comprimée décrites plus haut peuvent être réticulées selon les techniques décrites dans les exemples 2, 3 et 4.

EXEMPLE 14

35 Peaux reconstruites préparées respectivement soit à l'aide de la matrice poreuse réticulée par le DPPA décrite dans l'exemple 2, soit grâce à la matrice poreuse,

5 réticulée par le DPPA, de l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13, afin d'effectuer une comparaison entre un produit composite comprenant une couche poreuse collagénique surfacée par une membrane essentiellement compacte selon l'invention et un produit comprenant une couche poreuse collagénique seule non surfacée.

1°. Préparation des peaux reconstruites

a) Culture des fibroblaste humains normaux

10 On utilise des fibroblastes humains normaux résultant de prélèvements effectués indifféremment sur des sujets âgés ou jeunes, que l'on récupère et que l'on développe de manière classique pour l'homme de l'art pour les récupérer entre le sixième et le dixième passage.

15 On réalise un ensemencement à 250 000 cellules par cm² de matrice poreuse, respectivement soit le produit de comparaison comprenant seulement la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2, soit le produit composite selon l'invention comprenant la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13.

20 Le milieu de culture est composé de DMEM/HAM F12 50/50 (v/v) additionné à 10 % en poids de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 25 µg/ml de gentamycine, 1 µg/ml d'amphotéricine B, 50 µg/ml de vitamine C.

On réalise une culture pendant trois semaines en changeant le milieu trois fois par semaine.

25

b) Culture de kératinocytes humains normaux

On réalise ensuite la culture de kératinocytes humains normaux obtenus indifféremment sur des sujets jeunes ou âgés, que l'on récupère et cultive pour les prélever entre le premier et le troisième passage, selon les techniques de
 30 cultures bien connues de l'homme de l'art.

On réalise un ensemencement à 250 000 cellules par cm² de surface, soit de la surface de la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2 ; soit du produit composite selon l'invention comprenant la matrice poreuse réticulée par le DPPA de l'exemple 2, surfacée par une éponge de collagène comprimée dont
 35 l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13 et, dans ce cas,

l'ensemencement des kératinocytes a lieu sur la surface de la membrane essentiellement compacte de collagène.

La culture de ces produits comprenant à la fois un ensemencement de fibroblastes et de kératinocytes a lieu dans un milieu de Green composé de :

- 5 DMEM additionné de :
 - 30 % HAM F12,
 - 10 % de sérum de veau foetal,
 - 100 UI/ml de pénicilline,
 - 100 µg/ml de streptomycine,
 - 10 1 µg/ml d'amphotéricine B,
 - 2 µmol/ml de L-glutamine,
 - EGF (Epidermal Growth factor) 10 ng/ml,
 - insuline disponible dans le commerce sous la marque UMULINE®
 - 0,12 UI/ml,
 - 15 hydrocortisone 400 ng/ml,
 - toxine cholérique 10^{-12} mol/ml,
 - transferrine 5 µg/ml,
 - triiodothyronine à raison de $2 \cdot 10^{-9}$ M,
 - adénine $1,8 \cdot 10^{-7}$ mol/ml,
 - 20 vitamine C 50 µg/ml.

On réalise cette culture pendant une semaine en changeant les milieux tous les jours.

c) Culture du produit composite selon l'invention et de la couche poreuse non surfacée de comparaison

- 25 Après avoir réalisé la culture de l'étape b) pendant une semaine en changeant de milieux tous les jours, on émerge à l'interface air-liquide la couche de surface contenant les kératinocytes, alors que la couche contenant les fibroblastes reste immergée, suivi d'une culture pendant trois semaines dans du milieu d'émersion composé de :

- 30 DMEM additionné de :
 - 10 % de sérum de veau foetal,
 - 100 UI/ml de pénicilline,
 - 100 µg/ml de streptomycine,
 - 35 1 µg/ml d'amphotéricine B,
 - 2 µmol/ml de L-glutamine,

EGF 10 ng/ml,
insuline de marque UMULINE® 0,12 UI/ml,
hydrocortisone 400 ng/ml,
vitamine C 50 µg/ml.

5

Après 7 semaines de culture au total résultant des étapes a) à c), on obtient une peau reconstruite composée d'un derme reconstruit, les fibroblastes ayant colonisé la matrice tridimensionnelle collagénique, recouvert par un épiderme pluristratifié.

10

A l'interface dermo-épidermique, on note la présence d'une membrane basale où l'on peut mettre en évidence la présence de laminine de type I, de laminine de type 5, de collagène de type IV et de type VII par immunomarquage.

Ainsi, le surfaçage des matrices poreuses par une couche essentiellement compacte pour obtenir un produit composite selon l'invention permet d'obtenir, après trois semaines de préparation du derme équivalent, une plus grande quantité de fibroblastes en surface des matrices collagéniques avant l'épidermisation.

Dans le cas d'une matrice poreuse seule, c'est-à-dire non surfacée, si la couche superficielle de fibroblastes n'est pas complètement jointive, des kératinocytes peuvent s'infiltrer dans le derme équivalent sous-jacent et former des îlots kératinocytaires, traits caractéristiques totalement anormaux.

On constate ainsi que grâce à l'invention, qui utilise des couches plus compactes que celles qui pouvaient avoir été utilisées auparavant dans l'art antérieur, on obtient une meilleure sécurité contre la pénétration des kératinocytes.

On notera dans la description que l'abréviation DMEM signifie Dulbecco's Modified Eagle Medium.

EXEMPLE 15

Etude comparative respectivement de peaux reconstruites à partir de cellules de donneurs jeunes et de peaux reconstruites à partir de cellules de donneurs âgés, avec les produits composites selon la présente invention pour mesurer l'efficacité de principes actifs sur la production de laminines.

Dans cet exemple, on procède essentiellement comme décrit à l'exemple 14 concernant les cultures en utilisant le même produit composite selon la présente invention comprenant une couche ou matrice poreuse collagénique réticulée par le DPPA décrite dans l'exemple 2, surfacée par une éponge de

collagène comprimée, dont l'ensemble est réticulé par le DPPA, selon l'exemple 13, en procédant comme suit :

Préparation des peaux reconstruites

- 5 1) On a préparé respectivement des peaux reconstruites jeunes en procédant comme décrit à l'exemple 14, si ce n'est que les cellules respectivement de fibroblastes et de kératinocytes étaient issues de donneurs jeunes, c'est-à-dire ayant un âge compris entre 25 et 35 ans, et d'autre part des peaux reconstruites âgées ou matures obtenues par l'emploi de cellules de fibroblastes ou de
10 kératinocytes issues de donneurs âgés, dont l'âge est de plus de 55 ans.

a) Matériel et méthode

- Comme indiqué à l'exemple 14, étape a, on a tout d'abord réalisé l'ensemencement de matrices poreuses du produit composite de l'invention avec
15 des fibroblastes dermiques humains normaux issus soit de pools de cellules jeunes, soit de pools de cellules matures ou âgées, et on réalise une culture pendant 21 jours dans les conditions décrites à l'exemple 14 étape a.

- b) Après les 21 jours de culture précédents, des feuillets épidermiques préparés
20 séparément à partir des kératinocytes issus soit de pools de cellules jeunes, soit de pools de cellules matures sont ensemencés sur la surface de la membrane essentiellement compacte de collagène du produit composite.

- On réalise une culture pendant 14 jours dans les conditions décrites à l'exemple 14b.

25

2) Quantification des laminines

- Après les 14 jours de cultures de l'ensemble fibroblaste-kératinocyte, les laminines contenues dans les milieux d'incubation des peaux reconstruites respectivement jeunes ou matures, ainsi obtenues sont quantifiées à l'aide d'un kit
30 de dosage ELISA commercialement disponible (Takara, Japon).

 Ces résultats sont rapportés à la figure 3.

- La figure 3 montre que les peaux reconstruites matures contiennent environ deux fois moins de laminines que les peaux reconstruites jeunes (PRJ) servant de témoin à 100 %.

35

3) Mesure de l'effet inducteur d'un principe actif, tel qu'un extrait de malt fermenté commercialisé sous la marque BASALINE® par COLETICA, sur la production de laminines dans des peaux reconstruites jeunes et matures

5 Dans cet essai comparatif, on procède comme décrit ci-dessus, si ce n'est que pour les 14 jours de culture avec les kératinocytes, les peaux reconstituées jeunes ou matures sont maintenues en culture pendant 14 jours soit en l'absence (contrôle), soit en présence de 0,5 % en poids d'extraits de malt fermentés commercialement disponibles sous la marque BASALINE®,
10 COLETICA, France.

A la fin de la période d'incubation, comme dans l'exemple ci-dessus, les laminines contenues dans les milieux d'incubation étaient quantifiées par dosage ELISA.

Les résultats sont rapportés à la figure 4.

15 La tension à 100 % est constituée par le taux de laminines dans la Peau Reconstituée Agée ou PRA.

La figure 4 montre que le principe actif extrait de malt fermenté, ou BASALINE®, était capable de stimuler la production des laminines dans des peaux reconstruites matures. Dans les mêmes conditions, le principe actif extrait
20 de malt fermenté ou BASALINE® ne modifie pas de façon significative la production des laminines dans des peaux reconstruites jeunes, indiquée à la figure 5.

On constate ainsi que le principe actif extrait de malt fermenté ou BASALINE® augmente de 65 % la production de laminines de peaux
25 reconstruites matures.

De même, ce principe actif n'affecte pas les processus physiologiques impliqués dans la régulation de la production de laminines de peaux reconstruites jeunes.

Ces expériences ont permis d'évaluer la magnitude de l'effet
30 compensateur de l'extrait de malt fermenté ou BASALINE® défini comme la capacité de ce principe actif à réduire l'écart observé entre les productions de laminines de peaux constituées jeunes relativement aux peaux reconstituées matures.

La figure 5 montre que la différence entre les productions de laminines
35 de peaux reconstituées jeunes et de peaux reconstituées matures peut être réduite de 65 % par le principe actif, utilisé à 0,5 %.

REVENDICATIONS

1. Produit composite formant un support collagénique comprenant au moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une
5 membrane essentiellement compacte collagénique réalisée soit par un film collagénique préparé par séchage, de préférence à l'air ou dans un fluide gazeux, d'un gel de collagène, soit par une éponge collagénique très fortement comprimée.

2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit collagénique précité est choisi parmi du collagène et un mélange de collagène
10 avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, chitosane, et les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un alginat, un carraghénane.

3. Produit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'au moins une des deux couches, respectivement la couche poreuse et la membrane
15 essentiellement compacte, comprend des cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes, en particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

4. Produit selon la revendication 3, caractérisant à ce que les cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales
20 d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, adipocytes, sébocytes, chondrocytes, cellules osseuses, des chondrocytes, des ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine, normales ou génétiquement modifiées ou malignes.

5. Produit selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce qu'il contient des fibroblastes normaux génétiquement modifiés ou malins dans la couche poreuse et des cellules vivantes normales ou génétiquement modifiées ou malignes, à la surface de la membrane compacte en particulier choisies parmi des
25 kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.
30

6. Produit selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la compression de l'éponge collagénique comprimée est réalisée à une pression au minimum égale à environ 50 bars, équivalent à environ $50 \cdot 10^5$ Pa, de préférence
35 comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa), éventuellement cette

compression ayant lieu à une température comprise entre 20 et 80 degré C°, encore mieux entre 40 C° et 60 C°.

7. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la membrane essentiellement compacte est préparée préalablement à la
5 combinaison avec la couche poreuse, de préférence comprenant une éponge collagénique, en particulier en préparant la membrane et en la déposant sur un gel collagénique avant que l'ensemble ne soit congelé et lyophilisé pour obtenir ledit produit composite.

8. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en
10 que l'éponge collagénique est/ou le film collagénique est/ou la membrane collagénique, comprend du collagène d'origine mammifère, en particulier d'origine bovine.

9. Produit selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'au moins l'une des deux couches est réalisée à partir d'un gel collagénique
15 contenant un mélange de collagène soluble et de collagène insoluble, par exemple sous forme de fibres.

10. Produit selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le collagène est du collagène de type I et/ou de type III.

11. Procédé de fabrication d'un produit composite comprenant au
20 moins une couche poreuse collagénique revêtue sur au moins une face d'une membrane essentiellement compacte collagénique, caractérisé en ce que :

a) on prépare tout d'abord la membrane essentiellement compacte collagénique, soit par séchage d'un premier gel collagénique, de préférence par séchage à l'air ou à l'aide d'un fluide gazeux, soit par compression d'une éponge
25 collagénique obtenue par congélation- lyophilisation d'un gel collagénique ;

b) on prépare séparément un deuxième gel collagénique ;

c) soit on dépose la membrane essentiellement compacte sur le deuxième gel collagénique, soit on verse le deuxième gel collagénique sur la membrane essentiellement compacte ; et

30 d) on procède enfin à une congélation-lyophilisation de l'ensemble pour obtenir ledit produit composite.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on réalise une compression de l'éponge collagénique servant à préparer la membrane compacte à une pression au moins égale à 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa), de préférence
35 comprise entre 50 bars ($50 \cdot 10^5$ Pa) et 200 bars ($200 \cdot 10^5$ Pa).

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape de compression a lieu à une température comprise entre 20 et 80°C, encore de préférence entre 40°C et 60°C.

5 14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on utilise pour la préparation de l'éponge collagénique et/ou du film collagénique et/ou de la membrane collagénique, soit du collagène, soit un mélange de collagène avec un polysaccharide, en particulier un glycosaminoglycane, le chitosane, les dérivés du chitosane, la cellulose et les dérivés de la cellulose, le dextrane et ses dérivés, un alginat, un dérivé d'un
10 alginat, un carraghénane.

15 15. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on utilise du collagène d'origine mammifère, en particulier d'origine bovine.

16. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on réalise une réticulation d'au moins l'une des deux couches ou des deux.

15 17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la réticulation est une réticulation physique, en particulier une déshydratation thermique à chaud sous vide ou DHT, ou une réticulation chimique, en particulier au diphenylphosphorylazide ou DPPA, avec une aldéhyde telle que glutaraldéhyde, au carbodiimide et/ou succinimide.

20 18. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on ajoute lors de la fabrication un composé favorisant le développement cellulaire, en particulier un facteur de croissance, en particulier une cytokine, une chimiokine.

25 19. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on prévoit une étape d'introduction de cellules vivantes, normales ou modifiées génétiquement, ou malignes dans au moins une des deux couches, en particulier provenant de sujets jeunes ou âgés.

30 20. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que lesdites cellules vivantes sont choisies parmi le groupe consistant de fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, cellules de langerhans d'origine sanguine, cellules endothéliales d'origine sanguine, cellules sanguines, en particulier macrophages ou lymphocytes, des chondrocytes, cellules osseuses en particulier ostéoblastes, cellules de Merkel d'origine sanguine, des sébocytes, des adipocytes, des cellules nerveuses.

35 21. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on introduit des fibroblastes dans la couche poreuse.

22. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on dépose des cellules vivantes à la surface de la membrane compacte, en particulier choisies parmi des kératinocytes, des mélanocytes, des cellules de Merkel d'origine sanguine, des cellules de langerhans d'origine sanguine, des sébocytes, des cellules d'origine sanguine, des cellules nerveuses.

23. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules vivantes sont apportées soit par culture séquentielle, soit par culture concomitante entre les différents types de cellules, ces cellules provenant de culture ou de biopsie.

24. Utilisation du produit composite formant un support collagénique tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 9, ou tel qu'obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 22 pour la fabrication de peaux artificielles destinées notamment à réaliser des essais in vitro d'efficacité de substance potentiellement active, ou à reconstruire in vivo des zones de peau endommagées.

25. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce que les peaux artificielles sont obtenues soit sensiblement exclusivement à partir de cellules jeunes, soit sensiblement exclusivement à partir de cellules âgées, en particulier pour étudier le processus de vieillissement tissulaire et en particulier cutané et éventuellement tester l'efficacité de principes actifs sur ce processus.

SECTION 1 - VIEW OF SURFACE

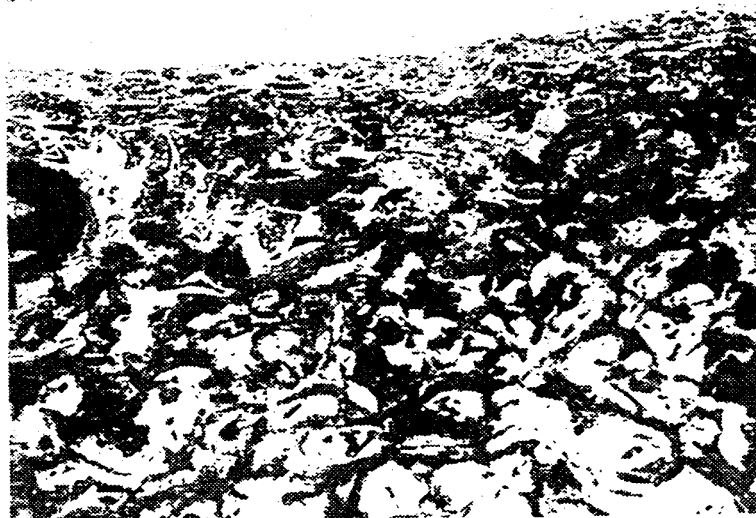


FIG.1
INVENTION

SECTION 2 -
ART ANTERIEUR

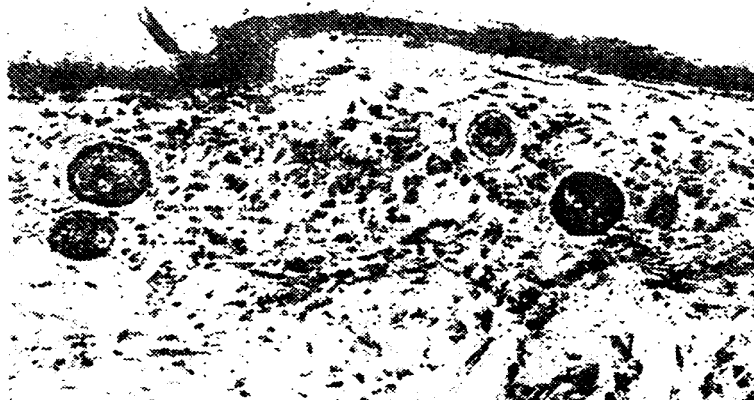


FIG.2
ART ANTERIEUR

2/2

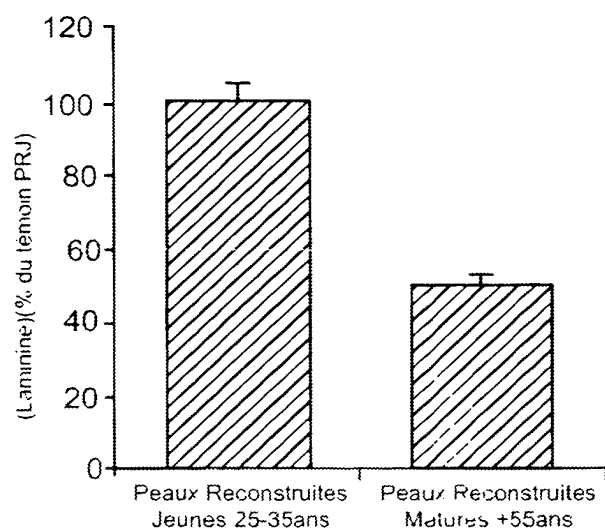


FIG.3

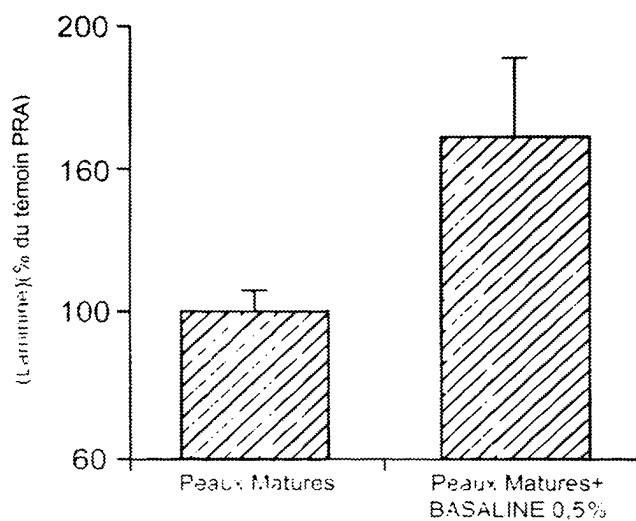


FIG.4

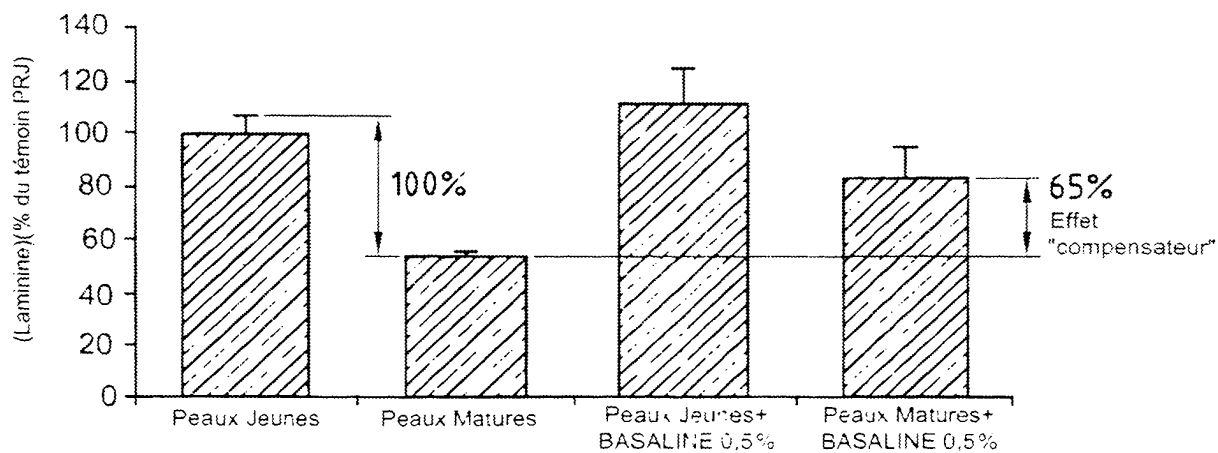


FIG.5